

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultad de Química

Departamento de Química Orgánica



‘Síntesis multifuncional de ciclopéptidos con propiedades antimicrobianas’

Karen Vilela Góñez

Grado en Química

Santiago de Compostela, Julio 2015

Departamento de Química Orgánica y
Centro Singular de Investigacións en Química Biolóxica e Materiais Moleculares
(CIQUS)

D. JUAN GRANJA GUILLÁN, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD EN EL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA Y D. MANUEL AMORÍN LÓPEZ, CONTRATADO PROFESOR INTERINO (T3) EN EL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA.

INFORMAN: que la memoria adjunta titulada “*Síntesis multifuncional de ciclopéptidos con propiedades antimicrobianas*” que presenta Karen Vilela Góñez para superar la asignatura Trabajo de Fin de Grao, perteneciente al Grao en Química, ha sido realizada bajo nuestra dirección en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica en el CIQUS y autorizamos su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, se expide la presente autorización en Santiago de Compostela a 10 de julio de 2015.

Fdo: Prof. Juan Granja Guillán

Fdo: Prof. Manuel Amorín López

Abreviaturas

δ	desplazamiento químico
Aa	aminoácido
ACN	acetonitrilo
All	alilo
Boc	tert-butiloxycarbonilo
CP	ciclopéptido
DCM	diclorometano
DIC	diisopropilcarbodiimida
DIEA	diisopropiletilamina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
equiv	equivalente
Fmoc	fluorenilmetiloxycarbonilo
Fmoc-OSu	<i>N</i> -(9-fluorenilmetoxycarboniloxi) succinimida
Gln	glutamina
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
[MH] ⁺	ión molecular
m/z	relación masa/carga
<i>N</i> -HATU	hexafluorofosfato del <i>N</i> -óxido de <i>N</i> - [(dimetalamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5- b]piridino-1-ilmetilen]- <i>N</i> -metilmetanaminio

<i>N</i> -HBTU	hexafluorofosfato del <i>N</i> -óxido del <i>N,N</i> -[(1H[(1H-benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metilen]- <i>N</i> -metilmetanaminio]
<i>N</i> -TBTU	tetrafluoroborato del <i>N</i> -óxido del <i>N</i> -[1H[1H-benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metilen]](- <i>N</i> -metilmetanaminio]
NMM	<i>N</i> -metilmorfolina
Prg	propargilglicina
SPPS	síntesis de péptidos en fase sólida
t_r	tiempo de retención
t.a.	temperatura ambiente
TFA	ácido trifluoroacético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TIS	triisopropil silano
TNBS	trinitrobencenosulfónico

Índice

1. Resumen (Abstract).....	1
2. Introducción.....	2
2.1. Resistencia bacteriana a los antibióticos.....	3
2.2. Nanotubos peptídicos.....	3
2.3. Péptidos antimicrobianos.	5
3. Objetivo	11
5. Parte experimental	15
5.1. Síntesis del Fmoc-<i>L</i>-Prg-OH	15
5.2. Desarrollo de la síntesis en fase sólida	15
5.3. Preparación del CP3.	21
6. Discusión de resultados	22
6.1. Selección del grupo protector.	23
6.2. Agentes de acoplamiento.	28
6.3. Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS).	30
6.4. Síntesis del péptido CP2a.	31
6.5. Ensayos de acoplamiento para obtener el CP3.	36
7. Conclusions	38
8. Anexo	39

1. Resumen (Abstract)

One of the most relevant characteristic of the Peptide Nanotubes is their antimicrobial properties. There is a great deal of interest in understand and develop this properties because of the increase of the antibiotic resistant problems of drugs. The antimicrobial mechanism of these peptide nanotubes consist in the formation of nanotubes on the pathogen membrane from simple cyclopeptide, increasing membrane permeability that cause the pathogen death. These nanotubes are formed by amphipathic cyclopeptides (CPs) with a hydrophobic region that interacts with the membrane external surface, providing the selectivity between mammalian and bacteria cell.

In this project, a CP was synthesized with the aim of studying its antimicrobial properties. The design of this CP is based on an amphipathic structure that contains a short hydrophobic residue beside an “alkyne” functional group that would allow the incorporation of different aliphatic chains. This hydrophobic tail would increase the interaction with the lipidic part of the membrane facilitating the insertion on the membrane while increasing the interaction with membranes. Additionally the hydrophilic region has a hydroxylamine moiety for the incorporation of different polar groups such as saccharides (mannose, glucose, etc.) that would increment the membrane selectivity. At the end from one single peptide platform, we can get different CPs with improved antimicrobial properties.

2. Introducción

La constante aparición de cepas bacterianas resistentes a antibióticos y la falta de nuevos medicamentos en el mercado han puesto de manifiesto los problemas sanitarios que podrían surgir en los próximos años como consecuencia de la carencia de un arsenal químico adecuado para combatir las superbacterias resistentes a múltiples agentes.¹ Es por esto que en los últimos años ha resurgido el interés en la búsqueda de nuevos fármacos antimicrobianos con novedosos mecanismos de acción.²

Los péptidos antimicrobianos³ son una clase de antibióticos en los cuales su diana terapéutica es la membrana celular del patógeno y su mecanismo de acción consiste en permeabilizar la membrana causando la muerte de dicho patógeno.⁴ Con este mecanismo de acción se dificulta la aparición de resistencias ya que, la muerte de las bacterias se suele producir a las concentraciones a las que se inhibe el crecimiento.

En la actualidad se han identificado cientos de péptidos antimicrobianos de origen natural y se han sintetizado numerosas variantes,^{5,6} siendo los nanotubos peptídicos un reciente descubrimiento en el campo de los péptidos antimicrobianos.⁷ Estos están basados en ciclopéptidos capaces de formar nanotubos en presencia de determinadas membranas.^{8,9}

¹ Zhan, J.; Weng, Q. "China legitimizes ivory, again" *Science*, **2015**, *348*, 1437-1438.

² O'Connell, K. M. G.; Hodgkinson, J. T.; Sore, H. F.; Welch, M.; Salmond, G. P. C.; Spring, D. R. "Combating Multidrug-Resistant Bacteria: Current Strategies for the Discovery of Novel Antibacterials" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10706-10733.

³ Midura-Nowaczek, K.; Markowska, A. "Antimicrobial Peptides and Their Analogs: Searching for New Potential Therapeutics" *Perspectives in Medicinal Chemistry* **2014**, *6*, 73-80.

⁴ Fjell, D. C.; Hiss, J. A.; Hancock, R. E. W.; Schneider, G. "Designing antimicrobial peptides: form follows function" **2012**, *11*, 37-51.

⁵ Coates, A.; Hu, Y.; Bax, R.; Page, C. "The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs" *Nature Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 895-910.

⁶ Melo, M. N.; Ferre, R.; Castanho, M. A. R. B. "Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations" *Nature Rev. Microbiology* **2009**, *7*, 245-250.

⁷ Fernandez, S.; Kim, H.; Choi, E. C.; Delgado, M.; Granja, J. R.; Khasanov, A.; Kraehenbuehl, K.; Long, G.; Weinberger, D. A.; Wilcoxon, K. M.; Ghadiri, M. R. "Antibacterial agents based on the cyclic D,L- α -peptide architecture" *Nature* **2001**, *412*, 452-455.

⁸ Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. "Self-assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture" *Nature* **1993**, *366*, 324-327.

⁹ Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, L. K. "Artificial transmembrane ion channels from self-assembling peptide nanotubes" *Nature* **1994**, *369*, 301-304.

2.1. Resistencia bacteriana a los antibióticos.

La investigación de las estructuras químicas de las que derivan los antibióticos utilizados hoy en día para el tratamiento de las enfermedades infecciosas se inició en 1928 tras el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming.

La mayoría de los antibióticos comercializados entre 1960-2000 son derivados sintéticos de la primera generación de agentes antimicrobianos como las penicilinas. Sin embargo, estos antibióticos son ineficaces contra ciertos microorganismos debido a la aparición de resistencias. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevos antibióticos eficaces ante dicha resistencias.

2.2. Nanotubos peptídicos.¹⁰

El autoensamblaje de péptidos cíclicos (CPs) constituidos por un número par de aminoácidos de configuración *D*- y *L*- de forma alterna, permite a los CPs asociarse para formar los nanotubos peptídicos. Esto es posible debido a que el CP adopta una conformación plana en la que los grupos N-H y C=O del esqueleto peptídico se disponen perpendicularmente al plano del ciclo y las cadenas laterales de los aminoácidos quedan orientadas hacia el exterior del mismo en una posición ecuatorial.⁸ Esta conformación permite que los ciclopéptidos se apilen gracias al establecimiento de una red de puentes de hidrógeno entre los distintos ciclos, generando supraestructuras con forma tubular (figura 2.1).

¹⁰ Bong, D. T.; Clark, T. D.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. "Self-Assembling Organic Nanotubes" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 988-1011.

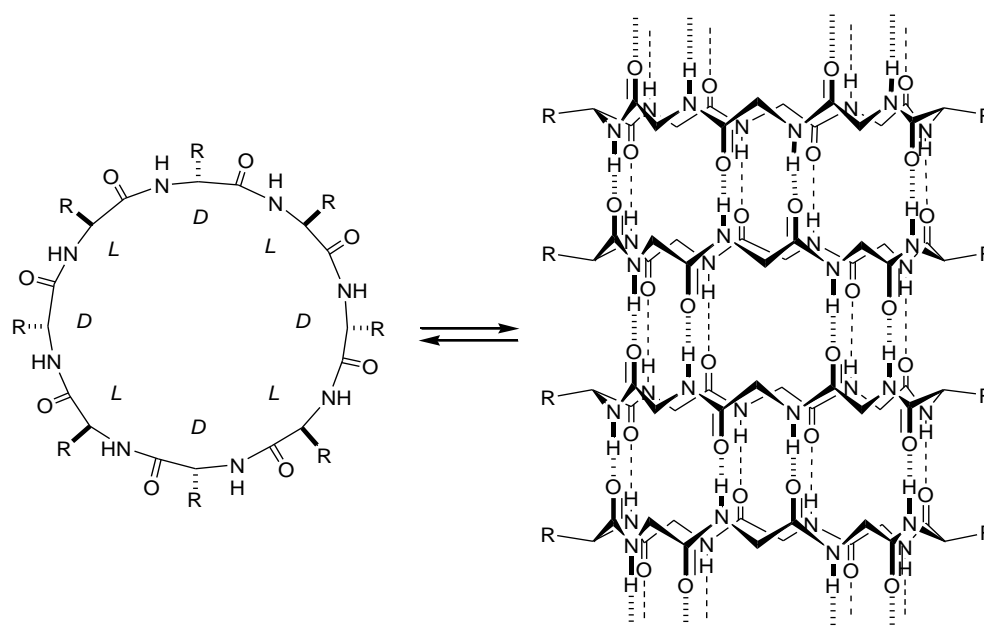


Figura 2.1. Representación de un nanotubo peptídico (derecha) formado por ciclopeptidos (izquierda) constituidos por α -aminoácidos de estereoquímica *D*- y *L*- alternada.

Los nanotubos peptídicos tienen como una de sus principales características el control previo del diámetro del canal ya que depende del tamaño del ciclo (el número de Aa) que forman la unidad básica (CP). Dicho diámetro hace especialmente apropiados a los nanotubos para el desarrollo de aplicaciones como los canales iónicos para el transporte iónico y moléculas a través de membranas biológicas.⁴

Los primeros nanotubos se prepararon en 1993 por el grupo de Ghadiri utilizando ciclopeptidos cuyas propiedades asociativas variaban con el pH del medio. En esta estrategia sencilla de variación del pH los CPs eran solubles a pH básico mientras que se asociaban cuando se neutralizaba el medio. Los estudios iniciales sobre la formación de nanotubos ciclopeptídicos se llevaron a cabo usando el octapeptido *ciclo*-[(*L*-Gln-*D*-Ala-*L*-Glu-*D*-Ala-)₂], el cual se seleccionó debido a su solubilidad en medio acuoso básico. La formación del nanotubo tenía lugar al acidificar de manera controlada una disolución básica del correspondiente ciclooctapeptido. Esta estrategia también permitió la obtención de agregados microcristalinos de nanotubos con diámetros internos de 13 Å, los cuales estaban constituidos por unidades del *ciclo*-[(*L*-Gln-*D*-Ala-*L*-Glu-*D*-Ala-)₃]¹¹, lo que confirmaba el potencial para controlar el diámetro de los nanotubos.

¹¹ Khazanovich, N.; Granja, J. R.; Milligan, A.; McRee, D. E.; Ghadiri, M. R. "Nanoscale Tubular Ensembles with Specified Internal Diameters. Design of a Self-Assembled Nanotube with a 13-Å Pore" *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6011-6012.

Posteriormente se demostró que si los CPs eran decorados con Aa como el Trp o la Leu, estos eran capaces de insertarse en membranas lipídicas y formar canales transmembranales⁸ capaces de transportar de forma eficiente los iones alcalinos. Una nueva modificación de la estructura primaria del CP para obtener péptidos anfipáticos condujo a unos nuevos derivados con potenciales propiedades.¹²

2.3. Péptidos antimicrobianos.

La selectividad que presentan los péptidos antimicrobianos entre bacterias y otras células, resulta de las diferencias existentes en las distintas membranas celulares. La membrana celular bacteriana presenta un bajo contenido en esteroides y un elevado contenido de fosfolípidos aniónicos así como una distribución asimétrica de los mismos concentrándose en la mitad exterior de la membrana.¹³ Esto favorece la interacción de los péptidos catiónicos con las membranas bacterianas y no con las membranas celulares animales. Numerosos estudios se han matizado con el fin de determinar el mecanismo de acción.⁶ En la mayoría de los casos, la muerte celular ocurre por un aumento en la permeabilidad de la membrana bacteriana, destruyendo el gradiente electroquímico vital para la célula o provocando la liberación del contenido celular.

Se han propuesto varios modelos para explicar la acción de estos péptidos.¹⁴ En ambos el primer paso es la interacción del péptido con la membrana debido a fuerzas electrostáticas en el caso de membranas bacterianas, y a interacciones hidrofóbicas en el caso de membranas mamíferas. Los diferentes modelos derivan de la estructura permeabilizante que se forma como el modelo “barril” y el modelo “alfombra” aunque

¹² Dartois, V.; Sanchez-Quesada, J.; Cabezas, E.; Chi, E.; Granja, J.; Ghadiri, M.R. “Systemic Antibacterial Activity of Novel Synthetic Cyclic Peptides” *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, 3302-3310.

¹³ Gennis, R. B. “Biomembranes: molecular structure and function” Springer, New York, USA **1989**.

¹⁴ Brogden, K. A. “Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?” *Nature Rev. Microbiology* **2005**, 3, 238-250

existen otros modelos adicionales como el “toroidal” que puede considerarse como una situación intermedia de los dos grandes modelos citados anteriormente.^{15,16,17,18,19}

En el modelo barril (en inglés, “barrel-stave”) los péptidos hidrofóbicos se encuentran en contacto con las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos y los residuos hidrofílicos están dirigidos hacia el interior del haz formando un poro acuoso. Estudios de infrarrojo (IR), y resonancia magnética nuclear (RMN) con la alameticina y la pardaxina muestran una disposición perpendicular de los péptidos con respecto a la membrana, apoyando la hipótesis de la formación de un canal transmembranal. Los estudios de conductividad muestran la existencia de canales de tamaño definido y de tiempos de vida relativamente largos.²⁰

En el modelo alfombra (en inglés, “carpet-like”), los péptidos se disponen inicialmente paralelos a la membrana cubriéndola parcialmente. En este estado inicial se observa cierta permeabilización de la membrana, pero no siempre conducen a la muerte celular. Estudios con la magainina mostraban que cuando se alcanzaba una relación crítica de péptido-lípido, había una transición en la que los péptidos se disponían perpendiculares a la membrana.¹⁸ Sin embargo, a diferencia con el modelo barril, estudios de RMN y fluorescencia mostraban que los péptidos estaban asociados con las cabezas polares de los lípidos y no con las cadenas hidrocarbonadas. Estas observaciones se explicaban por la formación de poros en los que complejos supramoleculares péptido-lípido recubrían el interior.

¹⁵ Bechinger, B. “The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy” *Biochem. Biophys. Acta* **1999**, 1462, 157-183.

¹⁶ Bechinger, B. “Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecroins, melittin and alamethicin” *J. Membr. Biol.* **1997**, 156, 197-211.

¹⁷ Huang, H. W. “Action of antimicrobial peptides: two-state model” *Biochemistry* **2000**, 39, 8347-8352.

¹⁸ Matsuzaki, K. “Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides” *Biochem. Biophys. Acta*, **1998**, 1376, 391-400.

¹⁹ Oren, Z.; Shai, Y. “Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides” *Biopolymers* **1999**, 47, 451-463.

²⁰ Gkeka, P.; Sarkisov, L. “Interactions of Phospholipid Bilayer with Several Classes of Amphiphilic α -Helical Peptides: Insights from Coarse-Grained Molecular Dynamics Simulations” *J. Phys. Chem.* **2010**, 114, 826-839.

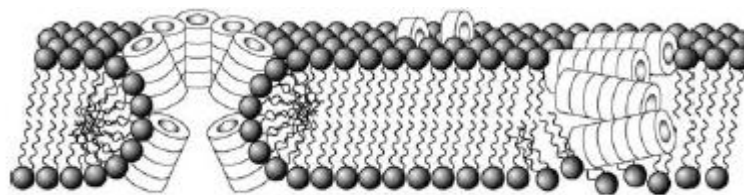


Figura 2.2. Propuesta de los posibles modelos para interpretar la actividad antimicrobiana de los nanotubos peptídicos. El modelo de barril (izquierda) donde los nanotubos generan canales transmembranosos, y el modelo alfombra (derecha), donde los péptidos recubren las membranas desestabilizándolos.²⁰

Los trabajos realizados por el grupo de Ghadiri con los nanotubos peptídicos indicaban que la actividad antimicrobiana se debía a la formación de nanotubos, y que éstos se orientaban casi paralelamente a la membrana lipídica. Por tanto, su actividad se basaba en el mecanismo tipo alfombra.^{7,21}

En estos estudios realizados por el grupo de Ghadiri se indicaban que los Aa hidrofílicos eran altamente importantes en la selectividad de los CP. Es por ello que propuso que era probable que una contribución significativa de la actividad de los péptidos se debiese a las interacciones de los residuos hidrofílicos con los sacáridos que recubren las membranas celulares, siendo estas interacciones las que además facilitaban la formación del nanotubo.²² No obstante, el CP debe poseer una parte hidrofóbica para que pueda insertarse en la membrana e interactuar con ella.

Un papel relevante en esta selectividad lo constituye la posibilidad de conseguir, a partir de un mismo ciclopéptido una gran variedad de nanotubos, ya que los CPs pueden autoensamblarse construyendo diferentes nanotubos en base a la orientación relativa entre ellos.

²¹ Kim, H. S.; Hartgerink, J. D.; Ghadiri, M. R. "Oriented Self-Assembly of Cyclic Peptide Nanotubes in Lipid Membranes" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4417-4424.

²² Dartois, V.; Sanchez-Quesada, J.; Cabezas, E.; Chi, E.; Dubbelde, C.; Dunn, C.; Granja, J. R.; Gritzen, C.; Weinberger, D.; Ghadiri, M. R.; Parr Jr, T. R. "Systemic Antibacterial Activity of Novel Synthetic Cyclic Peptides" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2005**, *49*, 3302-3310.

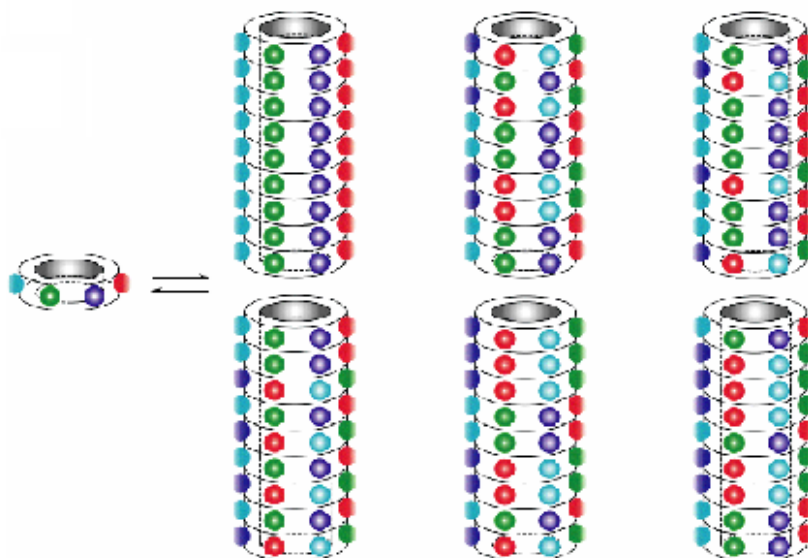


Figura 2.3. A partir de un único CP (prefármaco) se pueden preparar múltiples nanotubos (fármaco).

2.4. Glicopéptidos.

Un paso más en la preparación de nanotubos peptídicos antimicrobianos, lo supuso el descubrimiento de las mannopeptimicinas, los cuales son una nueva sub-clase de péptidos antimicrobianos aislados del *Streptomyces hygroscopicus*.²³ Estos glicopéptidos se caracterizan por poseer un anillo ciclohexapeptídico en el que se alternan aminoácidos de configuración *D*- y *L*-. Además, posee diversos residuos derivados de sacáridos en sus cadenas laterales y/o grupos guanidínios.

²³ He, H. "Manno-peptimycins, a novel class of glycopeptide antibiotics active against gram-positive bacteria" *Microbiol Biotechnol.* **2005**, 67, 444-452.

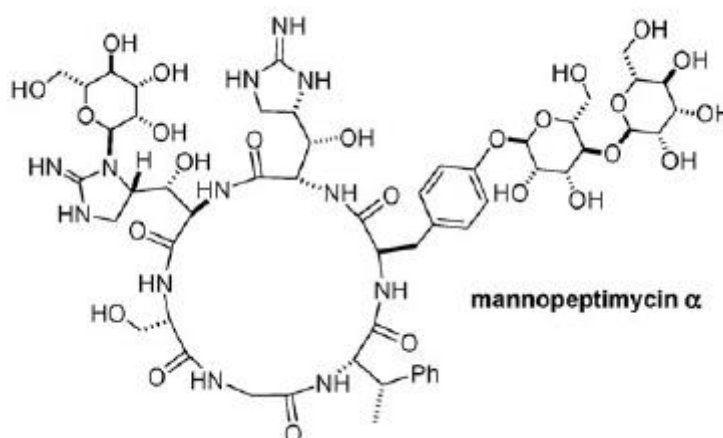


Figura 2.4. Estructura de la mannopeptimicina aislada del *Streptomyces*.

Utilizando este modelo, el grupo de Ghadiri diseñó un glicociclopéptido capaz de formar nanotubos, que presentaba una elevada actividad antibactericida, como consecuencia de que interfiere en la inserción de las proteínas de la bacteria en las membranas celulares.^{23,24} A diferencia de las mannoetimicinas, los *D,L*- α -ciclopéptidos se sintetizaban y se modificaban fácilmente hasta obtener las propiedades óptimas. Por tanto, el grupo de Ghadiri, preparó *D,L*- α -ciclopéptidos glicosilados, usando sacáridos derivados de *D*-glucosa, *D*-manosa y *D*-galactosa, cuyas propiedades antimicrobianas superan a las del *D,L*- α -ciclopéptidos en cuanto a selectividad entre membranas lipídicas de bacterias y mamíferos, aunque su actividad bactericida global no se incrementaba.

²⁴ Motiei, L.; Rahimipour, S.; Thayer, D. A.; Wong, C. H.; Ghadiri, M. R. "Antibacterial cyclic *D, L*- α -glycopetides" *Chem. Commun.* **2009**, 3693-3695.

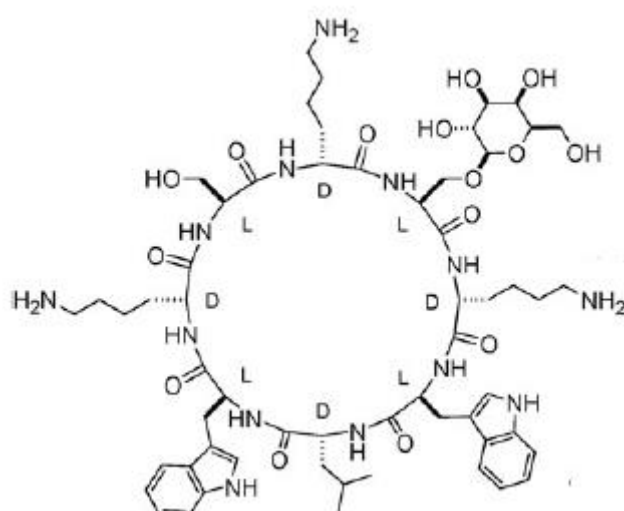


Figura 2.4. Estructura de uno de los glicopéptidos estudiados en el grupo del Prof. Ghadiri²⁴ para la formación de nanotubos peptídicos antimicrobianos.

3. Objetivo

El objetivo de este proyecto es la síntesis de ciclopeptidos anfipáticos con potencial actividad antimicrobiana gracias a la formación de nanotubos peptídicos en la presencia de membranas lipídicas de patógenos. Estos nanotubos peptídicos deberían distorsionar las propiedades aislantes de las membranas y causar la muerte del patógeno.

La adecuada selección de los aminoácidos (hidrofóbicos o hidrofílicos) que componen los ciclopeptidos dará lugar a que los nanotubos posean una parte hidrofóbica que interaccione con las cadenas carbonadas de las membranas, y una parte hidrofílica, que será la responsable de diferenciar entre las membranas de mamíferos y las de los patógenos (selectividad y toxicidad), además de proporcionarle solubilidad al CP.

Con la finalidad de disponer de una parte hidrofílica mayor en los CPs, y así, lograr una mayor selectividad de acción, nos proponemos incorporar un mayor número de Aa hidrofílicos, y además, disponer en dicha región del CP de sacáridos que, según los estudios llevados a cabo hasta el momento, éstos aumentan la diferenciación entre patógenos y células de mamíferos.^{17,18} Todo esto implica que el número de Aa hidrofóbicos debe disminuir, ya que los diseños más adecuados para generar nanotubos peptídicos son los formados por CPs de 8 aminoácidos. Por tanto, si el CP posee una pequeña región hidrofóbica, estos no interaccionarán de forma adecuada con las membranas lipídicas para dar lugar a los nanotubos. Esto último se podrá subsanar incorporando en la estructura del CP cadenas alifáticas (Figura 4.1).

En resumen, proponemos el desarrollo de una metodología sintética que permita preparar CPs que contengan dos grupos funcionales ortogonalmente funcionalizables que permitan por un lado incorporar diferentes sacáridos y por otro lado que permitan incorporar largas cadenas hidrocarbonadas. Uno de estos grupos podría ser un hidroxilano para la formación de oximas y el otro grupo sería un alquino que mediante una reacción 3+2 con azidas da lugar a triazoles.

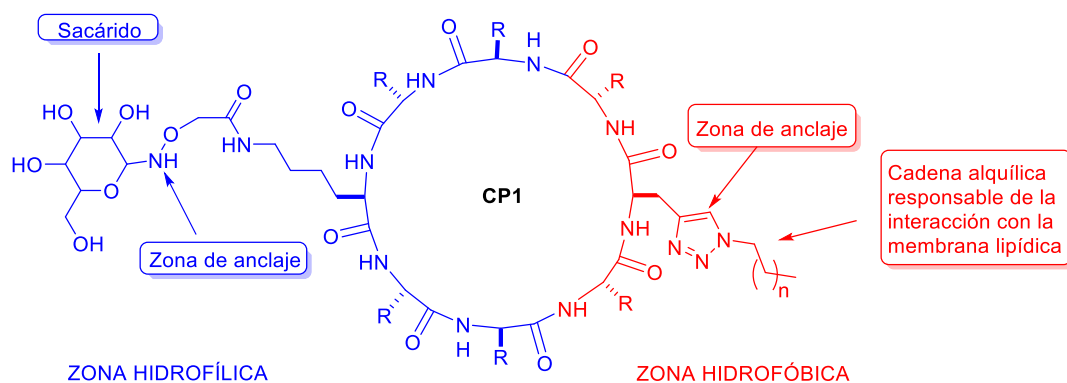


Figura 4.1. Estructura general de los ciclopéptidos **CP1** propuestos para ser sintetizados y estudiados como agentes antimicrobianos.

La estrategia sintética utilizada para lograr los CPs deseados consistirá en la síntesis del CP en fase sólida y su posterior modificación (post-modificación). Así, el sacárido se incorporará mediante la formación de una oxima con el CP, gracias a la hidroxilamina que estará presente en el mismo. Mientras que la incorporación de la cadena alifática, se realizará mediante una reacción de cicloadición entre el alquino presente en el CP y una cadena alifática que posea un grupo azida (Figuras 4.1 y 4.2).

Teniendo en cuenta estas características generales, nos propusimos como objetivo más concreto la preparación del ciclopéptido **CP1a**, que cumple los requisitos anteriormente mencionados, a partir del ciclopéptido **CP2a** que se sintetizará en fase sólida (Figura 4.2).

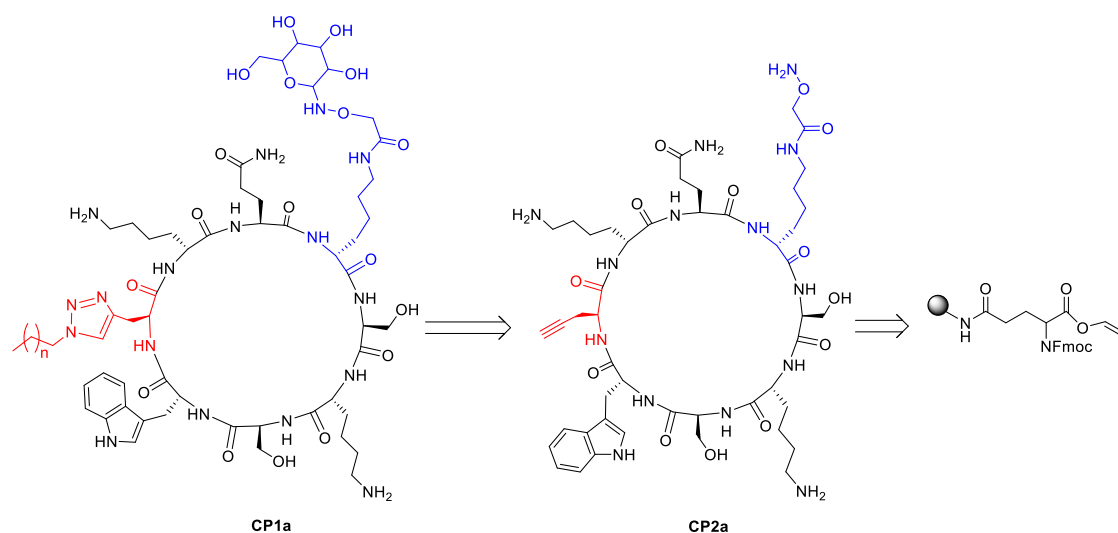


Figura 4.2. Esquema retrosintético para la obtención de un diseño “CP1” a partir de un diseño “CP2”, mediante la formación de una oxima y una reacción de cicloadición para la incorporación de un sacárido y una cadena alifática respectivamente. El CP2a será sintetizado en fase sólida a partir de los correspondientes aminoácidos.

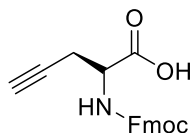
4. Materiales, métodos y técnicas experimentales

El hexafluorofosfato del *N*-óxido del *N*-[(1H-benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metilen]-*N*-metilmetanaminio (*N*-HBTU), el hexafluorofosfato del *N*-óxido de *N*-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-tiazolo[4,5-b]piridin-1-il-metilen]-*N*-metilmetanaminio (*N*-HATU); el tetrafluoroborato del *N*-óxido del *N*-[1H-benzotriazol-1-il)(dimetalamino)metilen]-*N*-metilmetanaminio (*N*-TBTU), el ácido [(tert-butoxycarbonylaminooxy]acético, los *N*-Fmoc aminoácidos y la *D*-manosa provienen de las casas comerciales Novabiochem, Aldrich o GL Biochem (Shangai) Ltd. La resina Rink Amida se compró a Novabiochem.

Todos los disolventes (DMF, MeOH, etc.) son de calidad de síntesis o HPLC, utilizándose directamente sin purificación adicional, excepto el DCM que se destiló utilizando CaH₂ como agente desecante y la DIEA que se destiló en primer lugar de ninhidrina y a continuación de hidruro cálcico, almacenándose sobre tamices moleculares. Los reactivos disponibles comercialmente se emplearon sin tratamiento previo. En cuanto a los reactivos sensibles al aire o a la humedad, se manejaron con jeringas y se adicionaron bajo una ligera presión de atmósfera inerte (argón). Para las cromatografías de capa fina se emplearon hojas de aluminio y gel de sílice (60 F₅₂₄ Merk). Los reveladores empleados fueron: UV (longitudes de onda de 365 nm y/o 254 nm) y los reveladores: ninhidrina (2% de ninhidrina en metanol) o Ce/Mo (200 mg de NH₄NO₃; 9,6 g de molibdato amónico; 11,2 ml de H₂SO₄ en 200 ml de H₂O), seguido de calor. En la cromatografía en columna se utilizó, como soporte sólido, sílica gel (E. Merck, tipo 60 SDS, 230.400 Mesh). La purificación líquida de alta (HPLC) se llevó a cabo en los equipos: a) Waters 2489 y/o b) Agilent Series 1200. La fase móvil utilizada se especifica en cada compuesto descrito, pero de forma general se empleó una mezcla de H₂O y ACN con 0,1% TFA utilizando a) una columna Phenomenex Luna 10u Sílica C18 (2) (250 mm x 21,20 mm) o b) una columna Agilent Eclipse XDB-C18, 5 µm (9,4 x 250 mm).

5. Parte experimental

5.1. Síntesis del Fmoc-*L*-Prg-OH



Fmoc-*L*-Prg-OH. El Boc-*L*-Prg-OH (503 mg, 2,37 mmol) se disolvió en una mezcla de DCM y TFA (1:1, 10 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min y a continuación se concentró en el rotavapor a sequedad. Tras diluir y concentrar el sólido resultante en DCM (3 x 5 mL), el sólido se secó a alto vacío durante 3 h. Posteriormente se disolvió en H₂O (10 mL), se trató con Na₂CO₃ (1,0 g; 9,43 mmol), dioxano (10 mL) y se añadió gota a gota una disolución de Fmoc-OSu (886 mg, 2,63 mmol) en dioxano (8 mL) mediante un embudo de presión compensada. Tras 12 h de agitación a t.a., el dioxano se concentró en el rotavapor y la disolución resultante se acidificó con HCl_{aq} (10%) hasta pH=3. El residuo se extrajo con DCM (3 x 15 ml), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró en el rotavapor. El producto se purificó por cromatografía en columna rápida de gel de sílice (0%-1,5% MeOH en DCM) para obtener 327 mg de **Fmoc-*L*-Prg-OH** como un sólido blanco [327,0 mg, 69,5%].

¹H-NMR(CDCl₃, 300 MHz, δ): 7,77 (d, J= 7,4 Hz, 2H, Ar-H); 7,61 (d, J= 7,2 Hz, 2H, Ar-H); 7,43-7,26 (m, 4H, Ar-H); 5,60 (d, J= 8,0 Hz, 1H, NH); 4,60 (ancho, 1H, H_α), 4,43 (d, J= 7,1 Hz, 2H, CH₂-Fmoc); 4,25 (t, J= 7,0 Hz, 1H, CH-Fmoc); 2,85 (s ancho, 2H, H_β); 2,11 (s, 1H, C≡C-H).

5.2. Desarrollo de la síntesis en fase sólida

La síntesis del *c*-[*D*-Lys(-COCH₂ONH₂)-*L*-Ser-*D*-Lys-*L*-Ser-*D*-Trp-*L*-Prg-*D*-Lys-*L*-Gln] (**CP2a**) se llevó a cabo en fase sólida utilizando como soporte sólido la resina Rink Amida (resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi) con una carga de 0,71 mmol/g.

La resina (200 mg) se depositó en un reactor de fase sólida y se lavó con DCM (2 x 1 mL). A continuación, se dejó hinchar la resina, agitando durante 1 hora la suspensión en DCM (3 mL). Transcurrido este tiempo, se filtró y se lavó con DMF (2 x 1 mL, 1 min).

Una vez acondicionada la resina, el grupo amino de la misma se liberó mediante el tratamiento con una mezcla de piperidina en DMF (1:4, 2 x 1 mL, 20 min), y finalmente se lavó con DMF (5 x 1 mL).

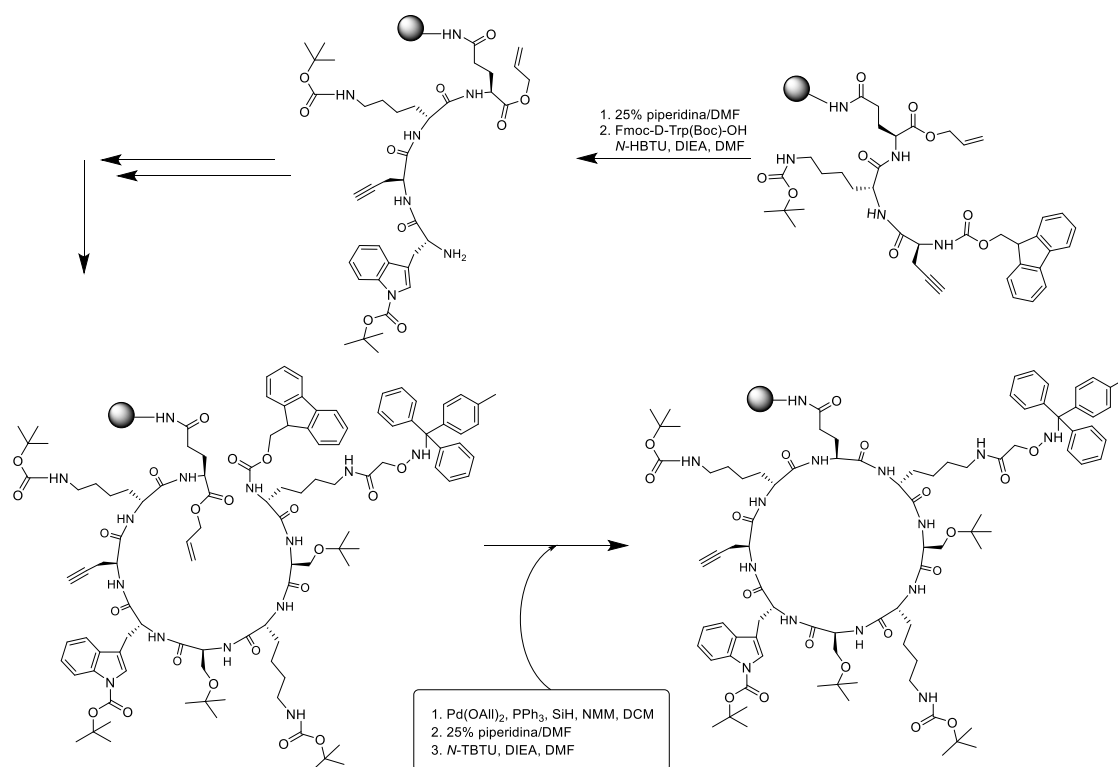


Figura 5.1. Esquema seguido para la síntesis del *c*-[D-Lys-L-Ser-D-Lys-L-Ser-D-Trp-L-Prg-D-Lys-L-Gln] (CP2a) en fase sólida (SPPS).

La síntesis del péptido se realizó siguiendo la secuencia de etapas que se describe a continuación.

- 1) Acoplamiento del primer aminoácido a la resina:** El primer aminoácido se unió al soporte sólido a través del grupo carboxilo de su cadena lateral. Una disolución del Fmoc-L-Gln-OAll (233 mg; 0,57 mmol) y el agente acoplante *N*-HBTU (215 mg; 0,57 mmol) en 1 mL de DMF se trató con DIEA (0,18 mL; 1,13 mmol). La mezcla obtenida se agitó durante 1 min para pre-activar el aminoácido y se vertió sobre la resina. La suspensión resultante se agitó durante 15 min, se filtró y finalmente la resina se lavó con DMF (3 x 1 min), dejándola preparada para la siguiente etapa.

- 2) **Desprotección:** Una vez comprobada la eficiencia del acoplamiento mediante el test TNBS²⁵, la resina se trató con una mezcla de piperidina en DMF (1:4, 2 x 2 mL, 15 min). Transcurrido este tiempo la resina se filtró y lavó con DMF (5 x 2 mL, 1 min) para eliminar los restos de piperidina.
- 3) **Acoplamientos:** En general, los acoplamientos se llevaron a cabo siguiendo el siguiente protocolo: una disolución del Fmoc-Aa-OH (4 equiv), N-HBTU (3,95 equiv) en DMF (1,8 mL) y DIEA (8 equiv). La mezcla resultante se agitó vigorosamente durante 1 min y a continuación se vertió sobre la resina y la suspensión obtenida se agitó durante 15 min. Transcurrido este tiempo la suspensión se filtró y la resina se lavó con DMF (3 x 1 mL, 1 min). Finalmente, la eficiencia de cada acoplamiento se determinó mediante el test TNBS. En caso de que dicho test fuese positivo (la resina torna a un color rojizo), se procedió a realizar un re-acoplamiento utilizando la mitad de los reactivos.

En cada uno de los acoplamientos se utilizaron las cantidades reflejadas en la Tabla 5.1:

Tabla 5.1: Cantidad de los distintos reactivos utilizados en cada uno de los acoplamientos.

	Aminoácido	Cantidad de Aminoácido	N-HBTU	DIEA
2° Aa	Fmoc-D-Lys(Boc)-OH	266 mg, 0,57 mmol	215 mg, 0,57 mmol	180 µL, 1,13 mmol
3° Aa	Fmoc-L-Prg-OH^a	143 mg, 0,43 mmol	161 mg, 0,43 mmol	135 µL, 0,85 mmol
4° Aa	Fmoc-D-Trp(Boc)-OH	299 mg, 0,57 mmol	215 mg, 0,57 mmol	180 µL, 1,13 mmol
5° Aa	Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH	216 mg, 0,57 mmol	215 mg, 0,57 mmol	180 µL, 1,13 mmol
6° Aa	Fmoc-D-Lys(Boc)-OH	266 mg, 0,57 mmol	215 mg, 0,57 mmol	180 µL, 1,13 mmol
7° Aa	Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH	216 mg, 0,57 mmol	215 mg, 0,57 mmol	180 µL, 1,13 mmol
8° Aa	Fmoc-D-Lys(Mtt)-OH^b	444 mg, 0,71 mmol	269 mg, 0,71 mmol	223 µL, 1.42 mmol

^a En este acoplamiento se utilizan 3 equivalentes ya que es un Aa muy costoso. ^b Para asegurarse que el último acoplamiento se realiza completamente se utilizan 5 equivalentes.

²⁵ Hancock, W. S.; Battersby, J. E. "A new micro-test for the detection of incomplete coupling reactions in solid-phase peptide synthesis using 2,4,6-trinitrobenzene-sulphonic acid" *Anal. Biochem.* **1976**, 71, 260-264.

4) Test TNBS: Se retiró una pequeña cantidad de resina (2-3 mg) que se puso en un eppendorf sobre el que se añadió una gota de disolución de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico en DMF (1 M) y una gota de una disolución 10% de DIEA en DMF. Tras agitar 20 segundos y centrifugar, la resina se torna de color rojo si hay aminos libres, es decir, el acoplamiento no fue completo. Si la resina queda transparente, el acoplamiento fue completo y se continúa con la síntesis.

5) Capping (bloqueo): Este proceso consiste en la acetilación del extremo N-terminal de las aminos libres que hayan podido quedar tras un acoplamiento, del cual no estamos seguros que se haya realizado de forma completa. Para ello se trata la resina con anhídrido acético (20 equiv), DIEA (10 equiv) y DMF (1mL) durante 10 min. A continuación se realizan lavados con DMF (3 x 1 min) y se continúa con la síntesis.

En este trabajo: el anhídrido acético (180 μ L, 1,92 mmol) y la DIEA (150 μ L, 0,96 mmol) se vierten sobre la resina y se deja agitando durante 10 minutos. La suspensión resultante se lavó y agitó con DMF (3 x 1 mL, 1 min) y con DCM (3 x 1 mL, 1 min). En esta síntesis dado que los test de TNBS eran algo dudosos se decidió realizar este proceso tras el acoplamiento 1º, 3º, 4º y 7º.

6) Ciclación: Una vez concluida la síntesis del péptido lineal se procedió a su ciclación sobre la misma resina, para lo cual se siguieron las siguientes etapas:

a) **Desprotección del extremo C-terminal:** Una disolución de PPh_3 (1,25 equiv, 47 mg, 0,18 mmol) en DCM (1 mL; previamente desgasificado) se trató con NMM (156 μ L, 1,42 mmol) y fenilsilano (175 μ L, 1,42 mmol) bajo argón. A continuación se preparó una disolución de $[\text{Pd}(\text{OAc})_2]$ (7,9 mg, 0,04 mmol) en DCM (1 mL, previamente desgasificado). La primera disolución se vertió sobre la resina seguida de la disolución de paladio y la suspensión resultante se agitó durante 12 h bajo argón. La resina se lavó con DCM (2 x 1 mL, 1 min), una disolución de etilditiocarbamato sódico en DMF (0,5%, 2 x 1 mL, 20 min), DMF (2 x 1 mL, 1 min), DIEA en DMF (2%, 2 x 1 mL, 1 min) y con DMF (2 x 1 mL, 1 min).

b) **Desprotección del extremo N-terminal:** La resina resultante del tratamiento con paladio se trató con piperidina en DMF (1:4, 2 x 1 mL, 20 min) y posteriormente con

DMF (3 x 1 mL, 4 min), DIEA en DMF (2%, 3 x 1 mL, 4 min), LiCl en DMF (2%, 2 x 1 mL, 1 min) y con DMF (2 x 1 mL, 1 min).

- c) **Ciclación:** Finalmente la resina se trató con una disolución de *N*-TBTU (138 mg, 0,42 mmol) y DIEA (271 μ L, 1,70 mmol) en DMF (1 mL) durante 12 h. La resina se filtró y lavó con DMF (2 x 1 mL, 3 min) y con DCM (2 x 3 mL, 3 min). La ciclación se siguió mediante HPLC-MS hasta la total desaparición del ion molecular del péptido lineal.

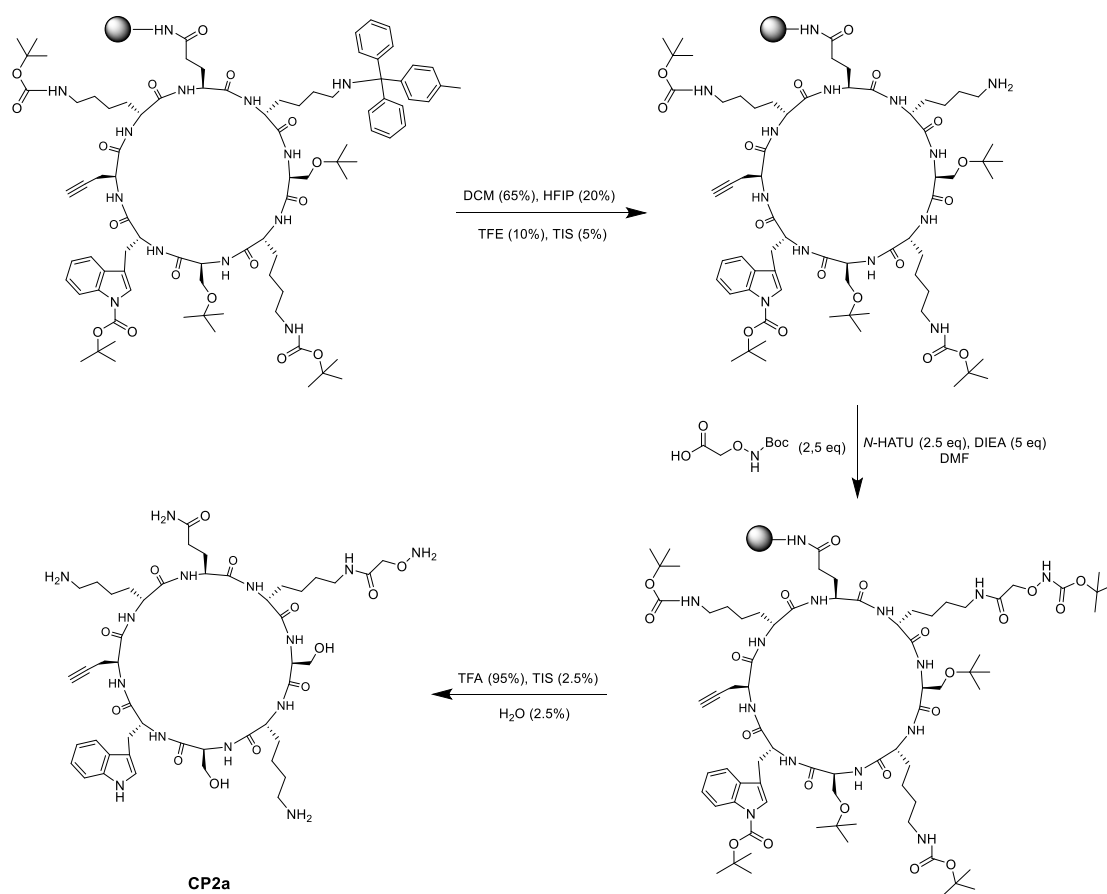


Figura 5.2. Esquema seguido para la post-funcionalización del **CP2a** con el [(tert-butoxycarbonyl)aminooxy]acético y su posterior separación del soporte polimérico.

- 7) **Desprotección del Mtt (4-Metiltritilo) y acoplamiento del ácido [(tert-butoxycarbonyl)aminooxy]acético:** Para la desprotección del grupo Mtt se preparó el cóctel de DCM (3,9 mL); 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (1,2 mL); 2,2,2-trifluoroetanol (600 μ L) y triisopropilsilano (300 μ L) en un vial. La mitad de la disolución resultante se vertió sobre la resina y la mezcla se agitó durante 2 h. Transcurrido este tiempo la mezcla se filtró, se añadió el resto de la disolución preparada sobre la resina y

se agitó durante 1 hora. Tras filtrar la resina por segunda vez, se lavó con DCM (3 x 1 mL, 1 min) y con DMF (2 x 2 mL, 10 min).

El ácido [(tert-butoxycarbonyl-aminoxy)acético (2,5 equiv, 68,4 mg, 0,36 mmol) se disolvió en DMF (1 mL) y se añadió sobre la resina. A continuación se añadió una disolución de *N*-HATU (2,5 equiv, 135,1 mg, 0,36 mmol) en DMF (1 mL) y finalmente se añadió una disolución de DIEA (5 equiv, 113 µL, 0,71 mmol) en DMF (0,5 mL). La suspensión de la resina se agitó durante 30 minutos, se filtró, y se lavó con DMF (3 x 1 mL, 1 min) y con DCM (3 x 1 mL, 1 min).

8) Separación del péptido de la resina y desprotección de las cadenas laterales de los α -aminoácidos: Para la separación del CP de la resina se añadió una mezcla de TFA, TIS y H₂O (95:2,5:2,5; 2 mL) sobre el reactor y se agitó durante 2 h. Posteriormente se filtró la resina y se lavó con TFA (1 x 1 mL, 1 min). La mayor parte del TFA de la disolución resultante se eliminó mediante el paso de una corriente de argón y el volumen restante se vertió en un tubo falcon y se mezcló con éter frío (20 mL). El péptido precipitado se centrifugó durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y se disolvió en H₂O Milli-Q. Finalmente esta disolución se purificó mediante HPLC en fase reversa (10% del disolvente B durante 5 min, y del 10% de B al 40% de B en 30 min, en los que A = 0,1% TFA/ H₂O y B = 0,1% TFA/ACN, t_R = 13 min); y se liofilizó para dar lugar al péptido deseado **CP2a** como un sólido blanco.

¹H NMR (300 MHz, DMSO, δ): 8.15 (d, J = 58.8 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.18 – 6.70 (m, 1H), 4.29 (s, 1H), 3.46 (d, J = 57.4 Hz, 6H), 2.84 – 2.61 (m, 1H), 2.52 (s, 6H), 2.05 (d, J = 6.1 Hz, 0H), 1.74 – 1.01 (m, 3H).

E.M. (ESI) [m/z (%)]: 1041,55 [$M+H$]⁺, 1063,53 [$M+Na$]⁺, 540,25 [$M+H$]²⁺.

5.3. Preparación del CP3.

En un eppendorf de 0,2 mL se añadió una disolución de **CP2a** en agua (5 mM, 100 μ L) y sobre ella se añadió una disolución de manosa en agua (120 mM) y una disolución de AcOH (200 mM) en agua. La mezcla resultante se agitó en un baño de agua a 60 $^{\circ}$ C durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo se comprobó por HPLC-MS la aparición de un pico correspondiente a la masa del producto deseado. La mezcla resultante se congeló y liofilizó dando lugar a **CP3**.

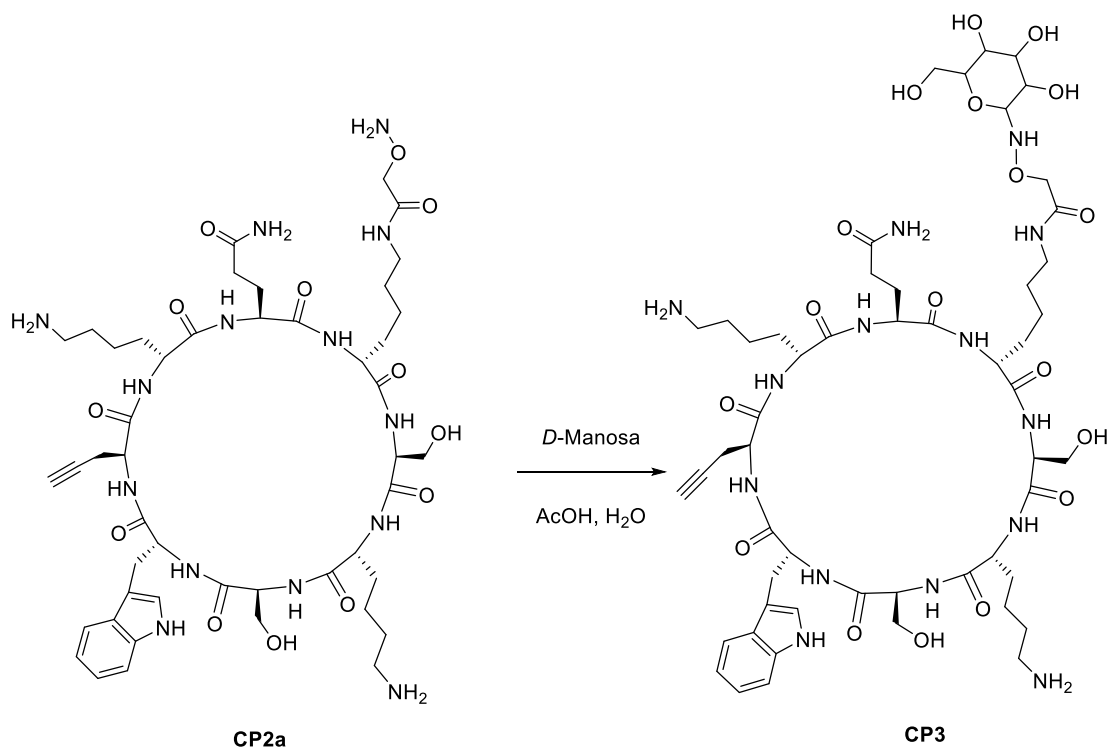


Figura 5.3. Esquema sintético seguido para la obtención del **CP3**.

6. Discusión de resultados

El objetivo de este trabajo es la puesta a punto de un nuevo diseño y metodología para preparar de forma rápida y eficiente, glicopéptidos cíclicos catiónicos y anfipáticos con propiedades antimicrobianas. Para ello se planteó una estrategia en la que a partir de un mismo ciclopéptido, mediante reacciones sencillas se puedan unir diferentes componentes que creen diversidad tanto en las partes hidrofóbica e hidrofílica del mismo.

Por ello propusimos la síntesis del **CP2a** que posee el grupo alquino terminal sobre el que se podrían anclar diversas cadenas alquílicas mediante una reacción tipo “click chemistry” (cicloadición 3+2) y un grupo hidroxilamina para la formación de la oxima con un sacárido. Estas dos etapas son elementos básicos de la diversificación estructural.

El **CP2a** posee un carácter anfipático con diversos grupos que aumenten la solubilidad en agua como Lys o Ser, y pueda interaccionar con la superficie exterior de las membranas incrementando la selectividad por las membranas bacterianas. Además el **CP2a**, dada la alternancia de *D*- y *L*-Aa puede formar nanotubos peptídicos bajo condiciones adecuadas. Dado el diseño del **CP2a** propuesto, se pensó que la fase sólida sería la forma más adecuada para su síntesis. Además pensamos en seleccionar un método que permita llevar a cabo la ciclación del péptido sobre la resina así como la incorporación del grupo hidroxilamina. Esto requiere de grupos protectores ortogonales que permitan realizar todas estas modificaciones. Para llevar a cabo este tipo de síntesis, se debe tener en cuenta diferentes factores como el tipo de resina, los grupos protectores, los agentes activantes, etc.

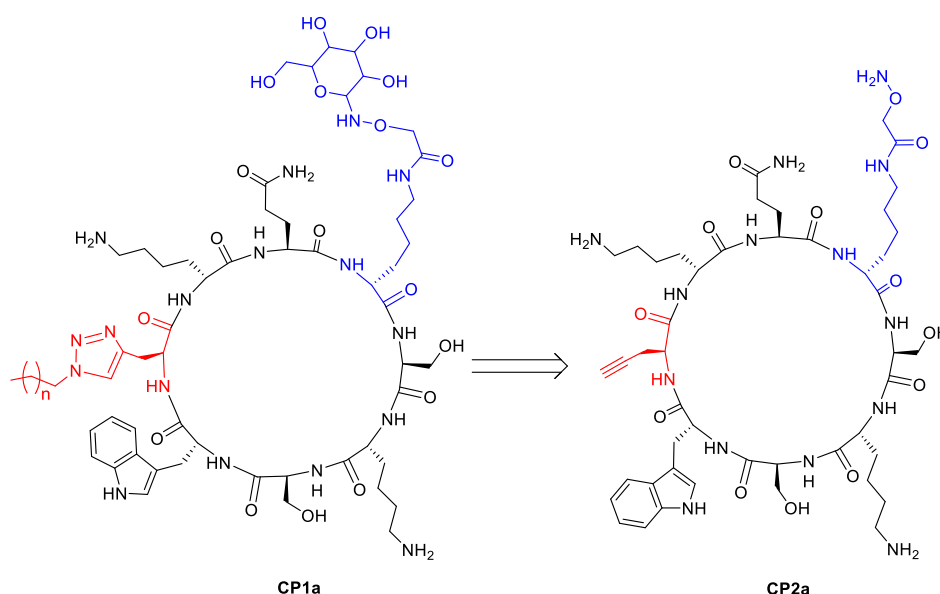


Figura 6.1. Estructura del diseño **CP1a** que se obtiene a partir de **CP2a**.

6.1. Selección del grupo protector.²⁶

En la síntesis de péptidos, tanto la cadena peptídica creciente, como el aminoácido que deseamos incorporar, son compuestos bifuncionales, que poseen un grupo ácido y un grupo amino. Para asegurarnos de que el enlace amida se forme entre los grupos deseados, se bloquea (protege) la amina y el ácido que no deben reaccionar generalmente mediante su unión al soporte sólido. Así, en la construcción del esqueleto peptídico se deben ir alternando pasos de formación de enlaces amida, y desprotección para liberar el grupo reactivo que va a participar en la formación del siguiente enlace. Además, la protección de las cadenas laterales de los aminoácidos, fundamental en esta metodología, evita que las cadenas laterales reaccionen con los grupos amino o carboxilo de otros aminoácidos, o que den lugar a otras reacciones secundarias. Así mismo, los grupos protectores se seleccionan de forma que dificulten la racemización del carbono α .

Un grupo protector ha de cumplir los siguientes requisitos:

1. Ser barato y de fácil disponibilidad.
2. Ser fácil y eficientemente incorporado sobre el grupo funcional.
3. Ser sencillo de caracterizar y evitar la formación de nuevos centros estereogénicos.

²⁶ Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. "Amino Acid-Protecting Groups" *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455–2504.

4. Ser estable frente a un amplio rango de reacciones y condiciones de extracción, así como frente a diversas técnicas de purificación y separación, tales como la cromatografía.
5. Debe ser fácil de eliminar, empleándose condiciones suaves que no alteren la formación del enlace peptídico.
6. Su eliminación debe ser efectiva y selectiva.
7. Los subproductos de la desprotección deben ser fácilmente separables.

En nuestro caso, los grupos funcionales más reactivos son las aminas (extremos N-terminal y las aminas de las cadenas laterales de las lisinas) y el ácido carboxílico (extremo C-terminal). Teniendo esto en cuenta, los grupos protectores elegidos fueron:

a) Fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc): Es uno de los grupos protectores de aminas más común. Este grupo protector es un carbamato muy estable a las condiciones ácidas, pero fácilmente eliminable en condiciones básicas. Estas propiedades hacen que sea un grupo protector ideal del extremo amino terminal en la síntesis de péptidos.

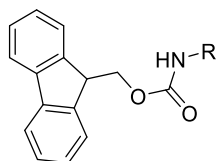


Figura 6.2. Estructura del grupo Fluorenilmetiloxycarbonilo.

La desprotección del grupo amino se llevaría a cabo mediante la adición de un nucleófilo o una base; generalmente se emplea una amina secundaria. La forma de desprotegerlo es mediante una disolución de piperidina en DMF al 20-25%. Normalmente la reacción concluye en 10-15 minutos. Tras la desprotección y lavados, el grupo amino queda desprotonado y listo para reaccionar con el siguiente aminoácido. Los subproductos como el N-fluorenilmetilpiperidinio y el dibenzofultereno pueden ser eliminados fácilmente por los correspondientes lavados.

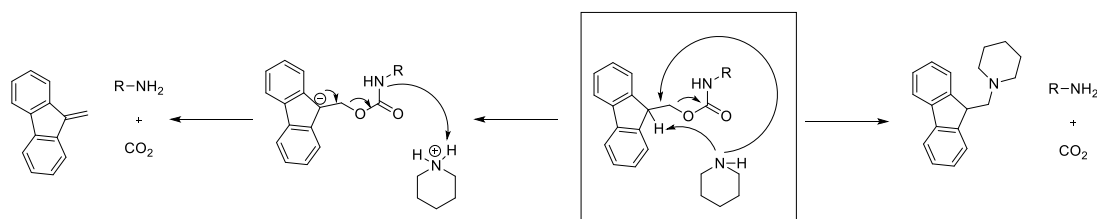


Figura 6.3. Mecanismo de desprotección del Fmoc.

b) Tert-butoxicarbonilo (Boc): Este grupo, al igual que el Fmoc, es uno de los grupos protectores más comunes del grupo amino de aminoácidos. El Boc es un carbamato muy estable en condiciones básicas, pero que se elimina en condiciones ácidas. Esto hace que sea un grupo protector bueno para aminas de cadenas laterales de los aminoácidos utilizados en la síntesis en fase sólida utilizando la estrategia Fmoc.

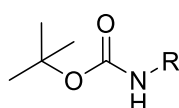


Figura 6.4. Estructura del tert-butoxicarbonilo.

La desprotección del grupo amino se lleva a cabo mediante la adición de un ácido fuerte como TFA o HCl. La forma más común de desprotegerlo es mediante la adición de ácido trifluoroacético. Normalmente la reacción concluye en menos de 5 minutos. En estas condiciones otros grupos sensibles al medio ácido como los bencilos no reaccionan. El principal problema es la formación de carbocationes que pueden dar reacciones de Friedel-Crafts en los anillos aromáticos.

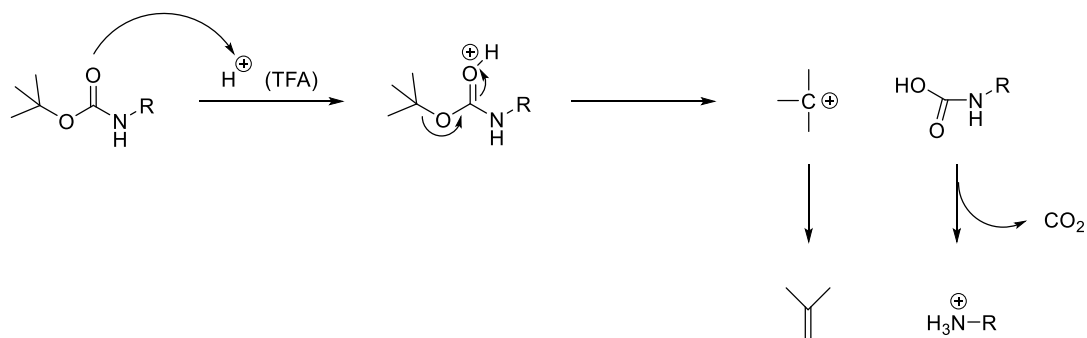


Figura 6.5. Mecanismo de desprotección del Boc.

c) 4-Metiltritilo (Mtt): Es un grupo protector de las aminas que es estable en condiciones básicas, pero muy lábil en condiciones ácidas suaves. Esto hace que pueda desprotegerse selectivamente en presencia de otros grupos protectores menos sensibles frente a ácido como los grupos tert-butilos o bencilos.

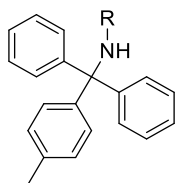


Figura 6.6. Estructura del 4-Metiltritilo.

La desprotección puede realizarse a $\text{pH}=4$, por lo que normalmente se usa ácido acético, condiciones en las que otros grupos protectores sensible al medio ácido, como el Boc, suelen ser estables. En este trabajo utilizamos un cóctel formado por HFIP, TFE y TIS en DCM (20:10:5:65) para su desprotección. La desprotección concluye en unas 3 h de reacción. Como en otras desprotecciones que transcurren a través del carbocatión es necesaria la adición de nucleófilos como el TIS para evitar las reacciones con los anillos aromáticos del catión trifenilmetilo.

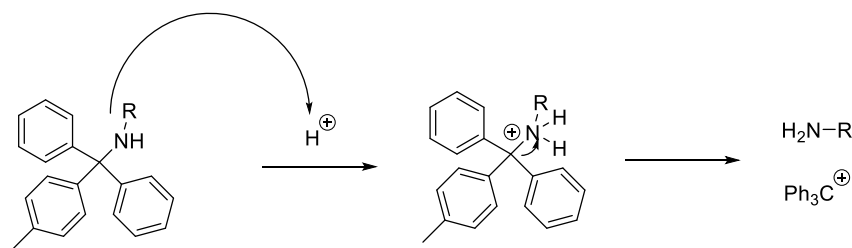


Figura 6.7. Mecanismo de desprotección del Mtt.

d) Tert-butilo (tBu): Es un grupo protector de alcoholes, cuya estabilidad y labilidad es semejante a la del grupo Boc. Por lo general salta bajo las mismas condiciones, medio ácido, que el grupo Boc.

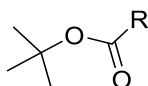


Figura 6.8. Estructura del tert-butilo.

e) Alilo (All): Este grupo se eligió para la protección del ácido carboxílico del primer aminoácido que se unió por su cadena lateral a la resina. También es un buen grupo para proteger alcoholes y aminas de las cadenas laterales de los aminoácidos debido a su ortogonalidad, permaneciendo generalmente inalterable bajo las condiciones de desprotección ácidas y básicas de los grupos Boc o Fmoc.

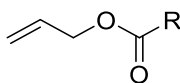


Figura 6.9. Estructura del alilo.

La desprotección se realiza en condiciones catalíticas empleando Pd(0) [Pd(PPh₃)₄] y un nucleófilo como la NMM. Bajo estas condiciones el Pd se coordina con la olefina y desplaza al grupo saliente (éster, alcohol) para formar el complejo Π -alilo de Pd(II). Este complejo sufre el ataque del nucleófilo para regenerar la especie catalítica de Pd (0). Estas condiciones son compatibles con cualquier grupo protector mencionado anteriormente (Boc, Fmoc, Mtt, etc.), por

lo que es muy útil por su ortogonalidad para hacer modificaciones sobre la secuencia peptídica.

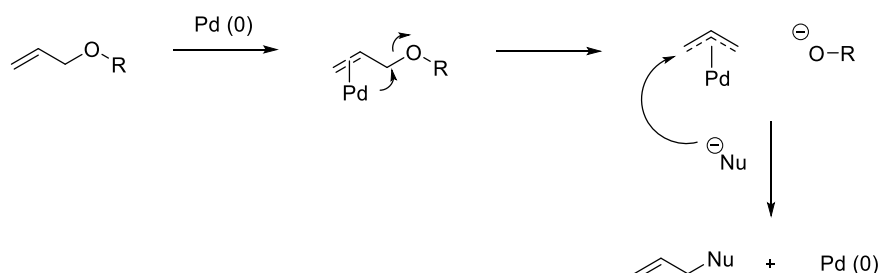


Figura 6.10. Mecanismo de desprotección del grupo alilo.

6.2. Agentes de acoplamiento.

Aunque el esqueleto principal de los péptidos está formado por enlaces amida, la variedad estructural y funcional de los aminoácidos proporciona un importante reto en el momento de formar el enlace químico entre el grupo carboxilo de un Aa y el grupo amino del otro. Así, la formación del enlace peptídico representa el paso crítico en la formación de péptidos o proteínas. Aunque ambos grupos carboxilo y amino pueden soportar el medio ácido estas condiciones son bastante drásticas por lo que son de difícil utilización en la síntesis de péptidos largos. Para que la reacción tenga lugar es necesario activar el grupo carboxilo. En síntesis orgánica se emplean los cloruros de ácido pero éstos tampoco son compatibles con la síntesis de péptidos. Es por ello que se requiere una activación menos agresiva.

Durante las últimas décadas, ha habido una gran evolución en el desarrollo de métodos de activación de aminoácidos y fragmentos peptídicos para su acoplamiento en la formación de péptidos, tanto para su aplicación en disolución como en fase sólida. Es por ello que se han desarrollado diversos agentes de acoplamiento que permiten la formación, en el mismo medio de reacción de un derivado del ácido carboxílico activado que facilita dichos acoplamientos. Estos intermedios, generalmente suelen ser ésteres, deben ser lo suficientemente estables para que no se descompongan con facilidad dando reacciones no deseadas pero al mismo tiempo ser lo suficientemente reactivos. Entre ellos hay que destacar las carbodiimidas (como EDC, DIC, etc.) o sales de aminio, como el *N*-

HATU, *N*-HBTU, *N*-TBTU, etc²⁷. Con estos agentes se forma un éster reactivo intermedio en el medio de reacción que reacciona rápidamente con los grupos amino libres de la cadena en crecimiento.

Para que la reacción transcurra en condiciones suaves se debe procurar que el agente activante escogido dé lugar a un éster bastante reactivo, para llevar a cabo la reacción con un alto rendimiento y en poco tiempo. Sin embargo la formación de ésteres activos también produce un aumento en la acidez de la posición α , lo que puede dar lugar a epimerizaciones. Esto puede minimizarse mediante el empleo de bases fuertemente impedidas.

Los agentes activantes utilizados en este trabajo, para la formación de los enlaces peptídicos, fueron el *N*-HATU, *N*-HBTU y *N*-TBTU.

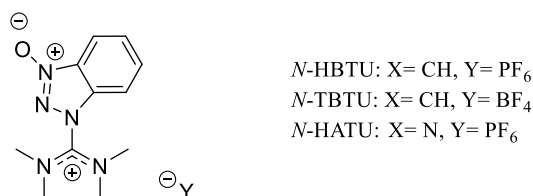


Figura 6.11. Estructura de los *N*-HATU, *N*-HBTU y *N*-TBTU.

Las distintas sales de aminio se diferencian fundamentalmente en su reactividad, ya que el mecanismo de activación es el mismo; en primer lugar reaccionan con el carboxilato libre dando lugar a la formación de un éster activo que inmediatamente reacciona con el hidroxibenzotriazol reactivo. De esta forma se incrementa la electrofilia del carbonilo, por lo que será más fácilmente atacado por la amina para dar lugar a la formación del enlace peptídico.

²⁷ El-Faham, A.; Albericio, F. "Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup" *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557-6602.

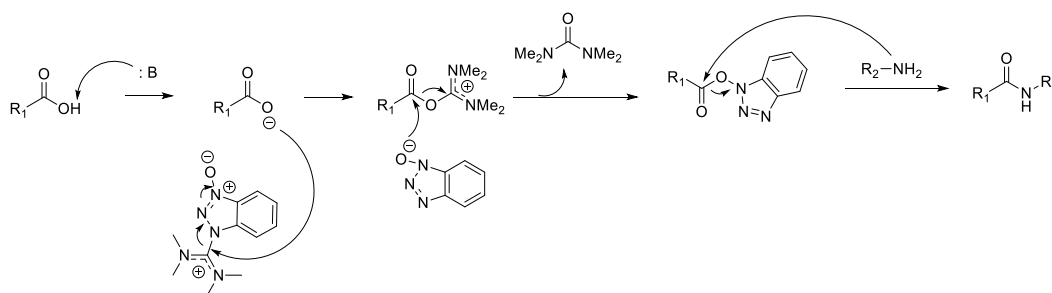


Figura 6.12. Mecanismo de activación del *N*-HBTU.

6.3. Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS).

La fase sólida (SPPS) ha sustituido en gran medida a la síntesis de péptidos en disolución, conocido como el método clásico de síntesis de péptidos. La razón de ello es que la SPPS es mucho más rápida y eficiente, ya que no hay que aislar y purificar tras cada etapa de acoplamiento del aminoácido deseado el péptido correspondiente. Por otro lado, el método clásico permite caracterizar el producto en cada etapa de reacción, mientras que en la fase sólida no se puede realizar una caracterización hasta el final de la síntesis. Esto hace que a lo largo de la síntesis sean necesarios rendimientos próximos al 100% en cada etapa, por lo que en la fase sólida se suelen utilizar grandes excesos de reactivos.

En esta síntesis, se parte de una resina insoluble y parcialmente funcionalizada a la cual se le unen los aminoácidos de forma secuencial mediante una reacción controlada con el grupo funcional presente en la serie. En general, la síntesis de los péptidos progresa desde el extremo C-terminal al extremo N-terminal, ya que se reduce de forma significativa la epimerización del péptido. El péptido crece unido a la resina hasta el final de la síntesis, cuando se separan. Por lo general, en esta etapa es deseable que también se produzca la desprotección de las cadenas laterales presentes en el péptido.

La SPPS sigue una pauta general de ciclos repetitivos de acoplamiento-lavado-desprotección-lavado. Normalmente, el extremo amino terminal libre de un péptido unido a la resina se copla con un aminoácido con el grupo amino protegido. Este grupo amino es desprotegido en la siguiente etapa, generando así un nuevo extremo amino libre con el que se puede iniciar el ciclo sintético de nuevo.

Hay dos métodos principales en fase sólida: la síntesis peptídica Fmoc y la síntesis peptídica t-Boc. El método t-Boc fue el primero en desarrollarse y se basa en el uso del t-

Boc como grupo protector del extremo amino. La fase sólida se inicia con la reacción del extremo C-terminal del aminoácido unido a la resina. A continuación, se desprotege el extremo amino mediante el tratamiento con un ácido fuerte como el TFA. Tras cada ciclo, se realiza un lavado con DCM y DMF para eliminar los reactivos sobrantes, con lo que se consiguen elevados grados de incorporación del aminoácido deseado. Por lo general, el extremo N-terminal queda protonado después de cada desprotección, pero no requiere de una etapa de lavado básico sino que, en los métodos actuales de preactivación *in situ* y acoplamiento se utiliza un exceso de base que sirve para desprotonar el grupo amino. Los grupos funcionales de las cadenas laterales reactivas están protegidos con grupos bencilo y otros resistentes a las condiciones ácidas. La rotura requiere, por lo general, condiciones ácidas fuertes.

El método Fmoc permite una acción de desprotección más suave. Este método utiliza generalmente una amina secundaria como base para la eliminación del grupo Fmoc, dejando al grupo amino libre para iniciar el ciclo de acoplamiento de los aminoácidos. Este método puede dar lugar a la formación de dicetopiperazinas, sobre todo cuando se utiliza alternancia de *D* y *L* aminoácidos.

En nuestro caso se eligió la síntesis en fase sólida debido a la insolubilidad en disolventes orgánicos del CP diseñado. Por otro lado, se seleccionó el método de Fmoc porque usa reactivos menos peligrosos y condiciones menos drásticas que los requeridos en la síntesis t-Boc, como son el tratamiento con HBr o el HF en la rotura final del péptido. Además, en nuestro caso hemos podido unir el primer Aa a la resina por su cadena lateral, lo cual nos permite su ciclación mientras aún está unido a la resina.

6.4. Síntesis del péptido CP2a.

La elección de los aminoácidos utilizados en la síntesis de α -ciclopéptidos se basó en los conocimientos previos de ciclopéptidos antimicrobianos. Por otro lado, se escogió el grupo hidroxilamina para permitir la unión al CP de un sacárido, ya que recientemente, se ha puesto a punto por el grupo de investigación un método para incorporar el grupo hidroxilamina al CP mientras aún está unido a la resina.

Por otro lado, se escogieron Aa que en condiciones fisiológicas posean una carga positiva (Lys, Arg, etc.) para que interaccionen con las cargas negativas presentes en las membranas de las bacterias.

Además, necesitamos incorporar un aminoácido que presente un grupo funcional, como un alquino, que nos permita unir una cadena carbonada para aumentar la interacción con la membrana.

El trabajo se inició con la preparación del Fmoc-*L*-Prg-OH que no estaba disponible en nuestro laboratorio. Este se preparó a partir del Boc-*L*-Prg-OH. El extremo amino se desprotegió con TFA en DCM y posteriormente la sal resultante se trató con Fmoc-OSu, en presencia de dioxano y disolución acuosa de Na₂CO₃ (10%), obteniéndose el producto deseado con un 70 % de rendimiento.

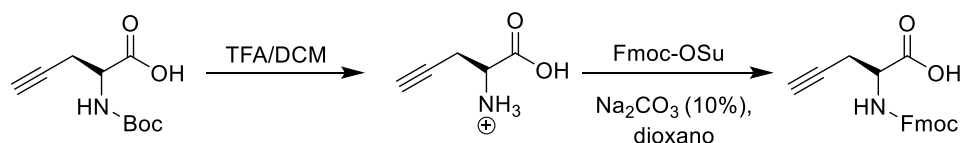


Figura 6.14. Esquema sintético para la obtención del Fmoc-*L*-Prg-OH.

Una vez se preparó el aminoácido necesario para la formación del péptido, se llevó a cabo la síntesis del **CP2a** en fase sólida mediante los ya comentados pasos de lavado-desprotección-acoplamiento. Después de incorporar los Aa en las posiciones 1, 3, 4 y 7, se realizó un tratamiento con anhídrido acético (capping) junto con DIEA durante 10 minutos dado que el test de TNBS daba resultados ambiguos y con ello nos aseguramos que no quedan cadenas sobre las que no se hubiese acoplado el Aa.

Una vez realizada la síntesis, se cicló el péptido sobre el soporte sólido. Para ello se eliminó inicialmente el grupo alilo por tratamiento con una disolución de Pd(0) en presencia de NMM y fenilsilano. A continuación la resina se trató con piperidina para eliminar el grupo fluorenilo. Finalmente se trató con 1 equivalente de un agente de acoplamiento, en este caso *N*-TBTU, para inducir la ciclación del péptido. La ciclación se siguió mediante la rotura de una pequeña porción de resina y la inyección del crudo de esta mezcla en el HPLC-MS para observar la desaparición del pico de la sustancia de partida y la aparición del producto de ciclación.

Una vez se comprobó que el péptido lineal está completamente ciclado, se procedió a eliminar el grupo Mtt de la Lys mediante su tratamiento con HFIP, TFE y TIS durante 30 min. A continuación se incorporó la hidroxilamina sobre la cadena lateral de la lisina. Dicho grupo se incorporó utilizando el ácido Boc-aminooxiacético que fue activado con *N*-HATU. La reacción se siguió de nuevo mediante HPLC-MS.

Una vez concluida la síntesis, el péptido se separó del soporte sólido mediante el tratamiento con el cóctel de TFA (TFA:TIS:H₂O, 95:2,5:2,5) durante 1 h. La resina se separó por centrifugación del **CP2a** y la disolución se trató con éter etílico para precipitar el péptido, el cual se purificó mediante HPLC en fase reversa, cuyo cromatograma y su HPLC-MS se muestran en las figuras 6.16. y 6.17 respectivamente.

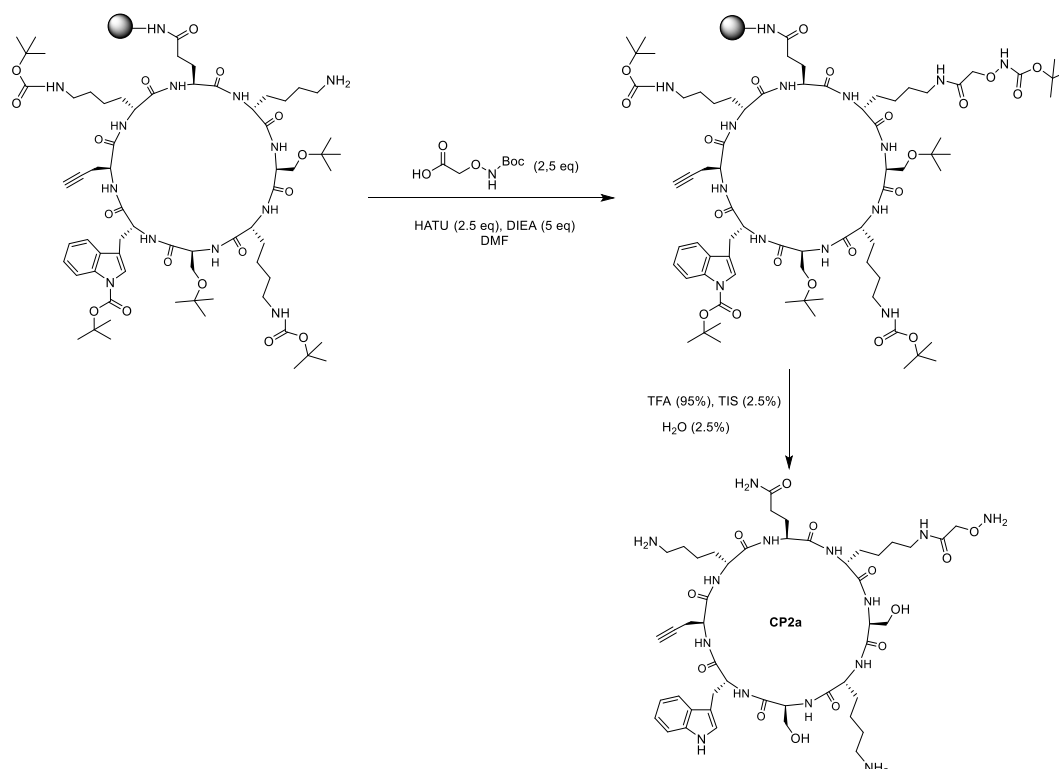


Figura 6.15. Ciclopéptido **CP2a** obtenido después del proceso de fase sólida.

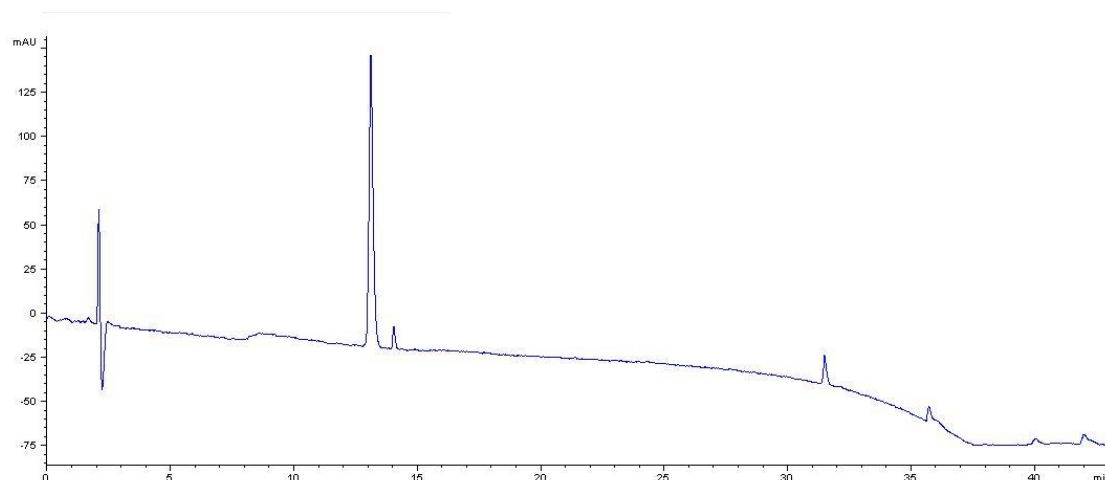


Figura 6.16. Cromatograma del ciclopéptido **CP2a** en fase reversa una vez separado de la resina, columna Phenomenex Luna 5u Sílica (5 μ m, 250 mm x 5.0 mm) (5% de disolvente B durante 5 min, y del 5% de B al 75% de B en 30min, en los que A= 0.1% TFA/H₂O y B= 0.1% TFA/ACN). El **CP2a** tiene un tiempo de retención de 13 minutos.

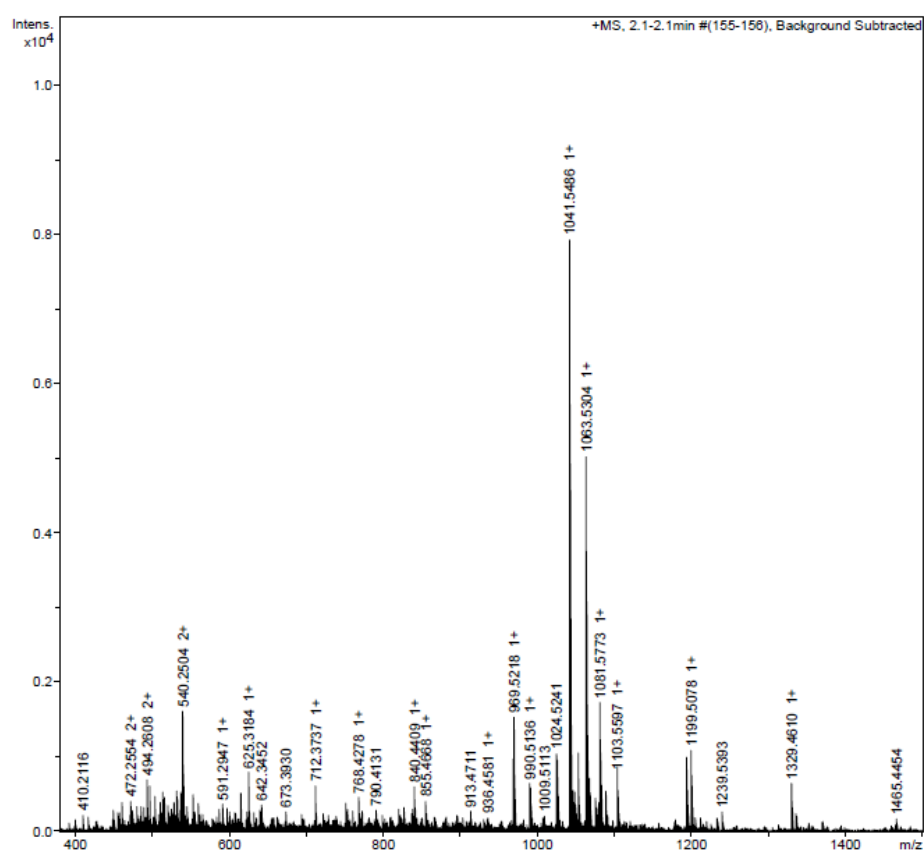
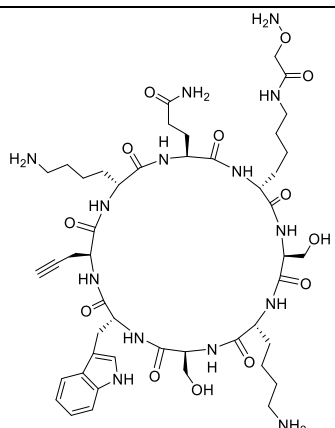


Figura 6.17. Espectro de masas del ciclopéptido **CP2a**. E.M. (ESI) [m/z(%): 1041,55 [M+H]⁺, 1063,53 [M+Na]⁺, 540,25 [M+H]²⁺.

Una vez obtenido **CP2a** se realizaron ensayos en sistemas biológicos (bacterias) para comprobar su posible actividad como agente antimicrobiano. Para estos estudios se utilizaron bacterias gram-positivas como *S. aureus*, *S. epidermis* y *E. faecalis*. Además se utilizó la bacteria *E. Coli* como ejemplo de bacteria gram-negativa. En la tabla 6.1 se recogen las diferentes bacterias utilizadas en el estudio y la concentración mínima inhibitoria (MIC) que es la concentración más baja de antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación.

Tabla 6.1: Datos obtenidos en los estudios microbiológicos realizados con **CP2a**.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>
 <p>MIC CP2a (µg/mL)</p>	30	16	125	125

Por tanto, el ciclopéptido **CP2a** puede ser utilizado como agente antimicrobiano para las bacterias que hemos estudiado.

6.5. Ensayos de acoplamiento para obtener el CP3.²⁸

Una vez concluida la síntesis del ciclopéptido decidimos abordar las etapas de funcionalización. Para ello empezamos con la incorporación de un sacárido para lo que seleccionamos la manosa. Se sabe que los azúcares con su carbono anomérico libre reaccionan con hidroxilaminas para formar la correspondiente oxima que está en equilibrio con la forma cerrada.²⁹

La formación de la oxima se estudió haciendo reaccionar el péptido **CP2a** con un exceso de manosa en una disolución acuosa ácida (AcOH). Transcurridas 2 horas de calentamiento a 60° se observó la desaparición de la sustancia de partida en el HPLC-MS así como una nueva señal cuya masa coincidía con el producto deseado. Tras liofilizar la muestra se analizó por HPLC obteniendo su cromatograma y su espectro de masas que se muestran en las figuras 6.19 y 6.20 respectivamente.

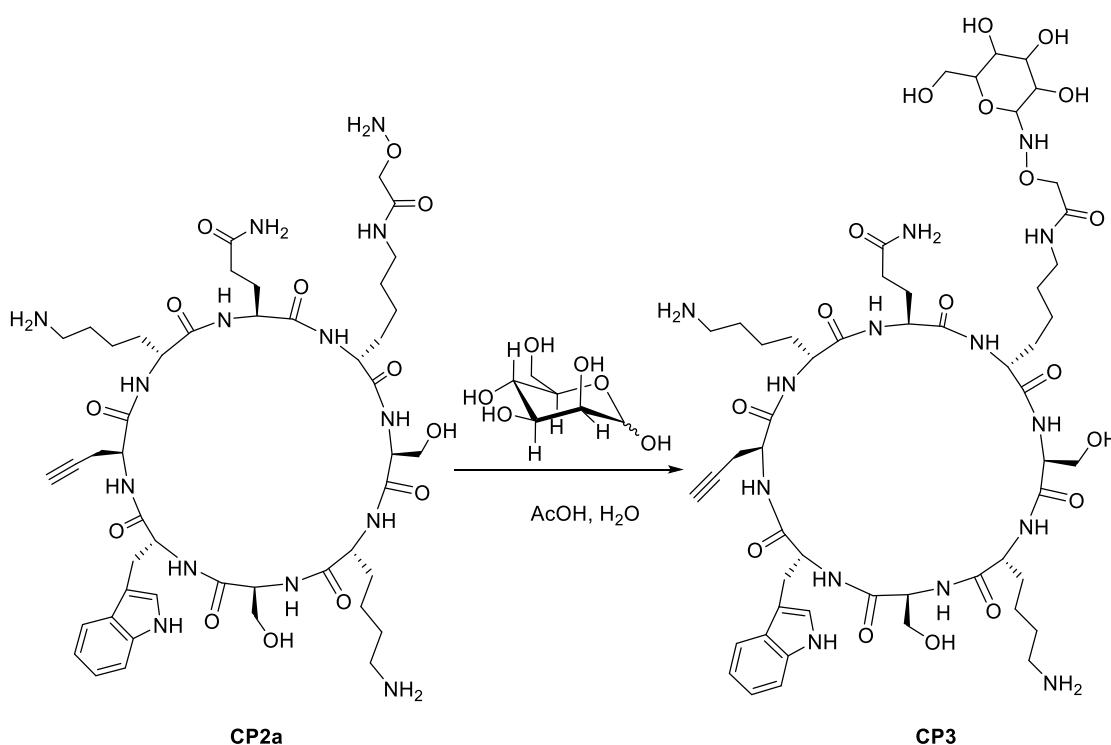


Figura 6.18. Reacción del ciclopéptido **CP2a** con la manosa para la obtención de **CP3**.

²⁸ Thygesen, M. B.; Munch, H.; Sauer, J.; Cló, E.; Jorgensen, M. R.; Hindsgaul, O.; Jensen, K.J. "Nucleophilic Catalysis of Carbohydrate Oxime Formation by Anilines" *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 1752-1755.

²⁹ Thygesen, M. B.; Sauer, J.; Jensen, K. J. "Chemoselective Capture of Glycans for Analysis on Gold Nanoparticles: Carbohydrate Oxime Tautomers Provide Functional Recognition by Proteins" *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 1649-1660.

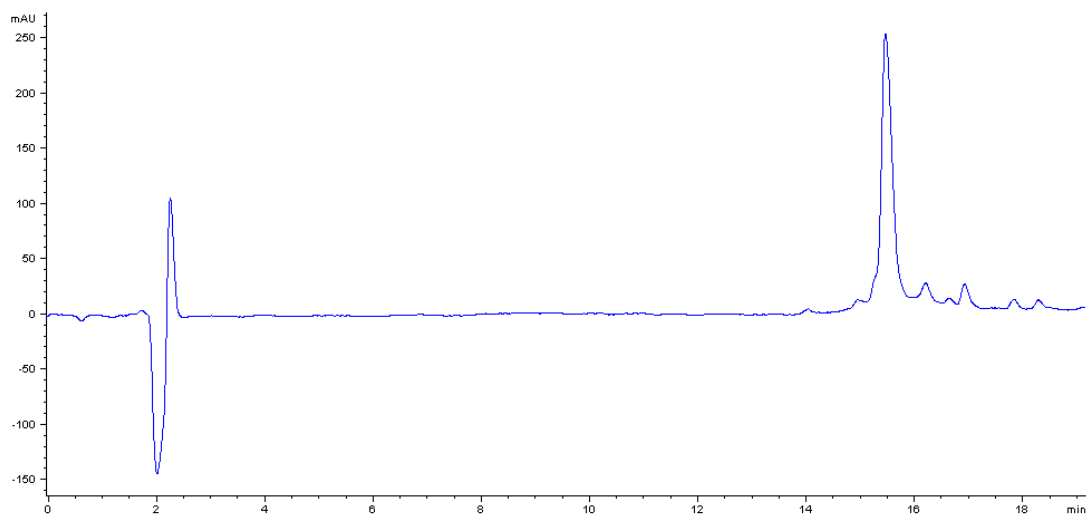


Figura 6.19. Cromatograma del ciclopeptido **CP3** en fase reversa, columna Phenomenex Luna 5u Sílica (5 μ m, 250 mm x 5.0 mm) (5% de disolvente B durante 5 min, y del 5% de B al 75% de B en 30min, en los que A= 0.1% TFA/H₂O y B= 0.1% TFA/ACN). El **CP3** tiene un tiempo de retención de 15 minutos.

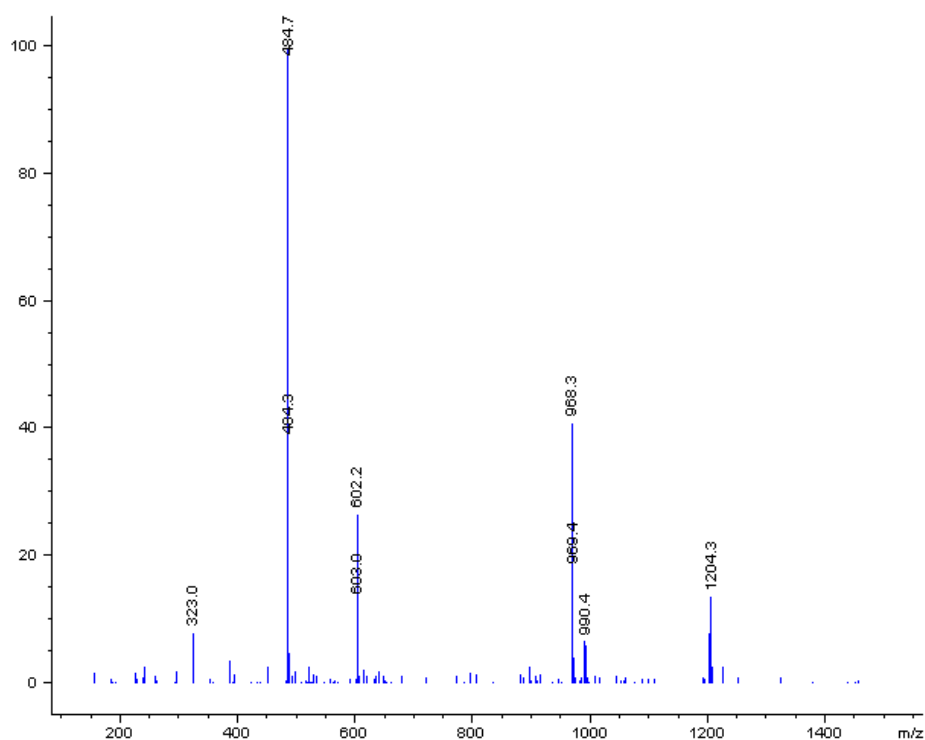


Figura 6.20. Espectro de masas del ciclopeptido **CP3**. E.M. [m/z(%)]: 1204,3 [M+H]⁺, 602,2 [M+H]²⁺.

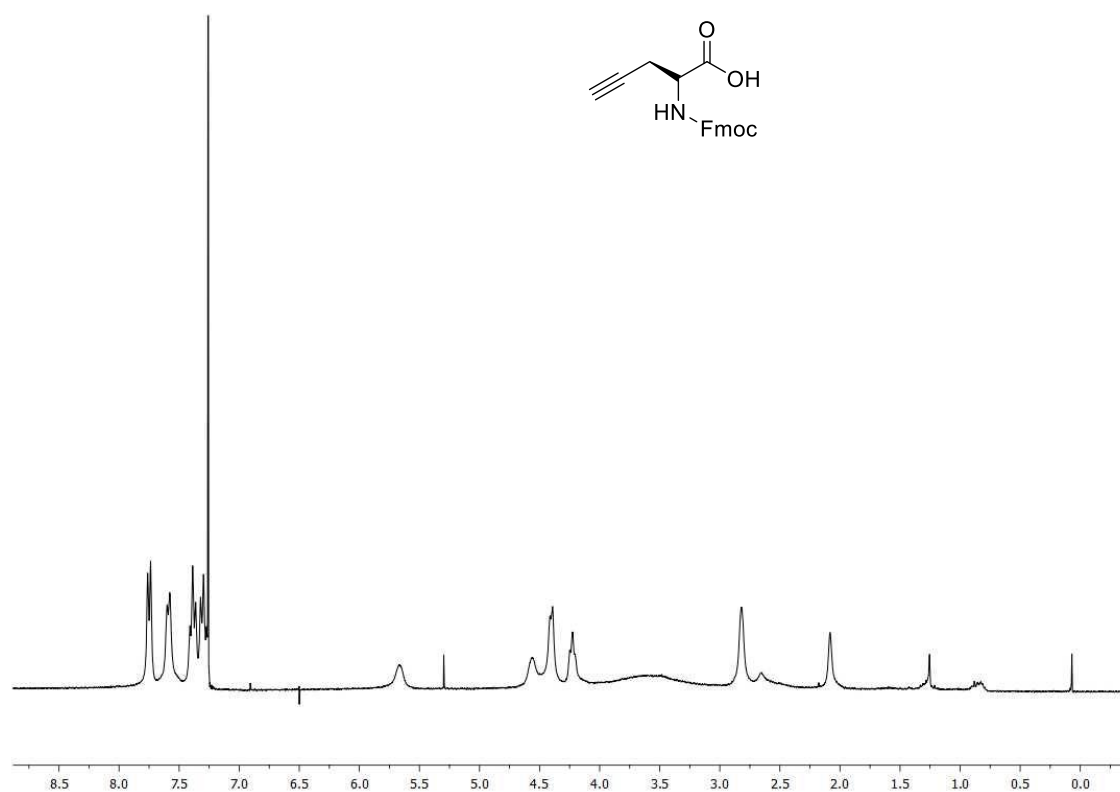
7. Conclusions

After the work in the lab, we have obtained the following conclusions:

- We have synthesized the Fmoc-*L*-Prg amino acid. This amino is part of the structure of our cyclopeptide **CP2a**.
- We have prepared the cyclopeptide *c*-[*D*-Lys(-COCH₂ONH₂)-*L*-Ser-*D*-Lys-*L*-Ser-*D*-Trp-*L*-Prg-*D*-Lys-*L*-Gln] (**CP2a**) in good yields. This CP has been prepared using solid phase peptide synthesis (SPPS).
- We have synthesized **CP2a-D-mannose** from the **CP2a** and the *D*-mannose with a moderate yield.

8. Anexo

^1H -RMN Fmoc-*L*-Prg-OH. (300 Mhz, CDCl_3 , 298 K)



^1H -RMN **CP2a**. (300 Mhz, DMSO, 298 K)

